Aus dem Physiologischen Institut
Lehrstuhl für Klinische Physiologie
(Direktor: Prof. Dr. R. Kaufmann)
der Universität Düsseldorf

Elektrophysiologische und inotrope Wirkungen von TIAPAMIL (Ro 11—1781) auf den isolierten Papillarmuskel und Sinusknoten der Katze

Dissertation
zur Erlangung des Grades eines
Doktors der Medizin
der Medizinischen Fakultät
der Universität Düsseldorf

vorgelegt von
Gerhard Epp

1981

1982

Elektrophysiologische und inotrope Wirkungen von TIAPAMIL (Ro 11-1781) auf den isolierten Papillarmuskel und Sinusknoten der Katze.

Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41536505_0057

Aus dem Physiologischen Institut
Lehrstuhl für Klinische Physiologie
(Direktor: Prof. Dr. R. Kaufmann)
der Universität Düsseldorf

Elektrophysiologische und inotrope Wirkungen von TIAPAMIL (Ro 11-1781) auf den isolierten Papillarmuskel und Sinusknoten der Katze.

Dissertation
zur Erlangung des Grades eines
Doktors der Medizin
der Medizinischen Fakultät
der Universität Düsseldorf

vorgelegt von
Gerhard Epp

1981

"Gedruckt mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät
der Universität Düsseldorf"

Der Dekan
der Medizinischen Fakultät
der Universität Düsseldorf

gez.: Prof. Dr. G. Arnold

Referent
gez.: Priv. Doz. Dr. Bayer

Korreferent

gez.: Priv. Doz. Dr. Breithardt

UNIV.
LEIDEN
BIBL.

Diese Arbeit wurde angeregt von den Herren
Prof. Dr. R. Kaufmann und Priv.Doz. Dr. R. Bayer.
Herr Dr. Bayer hat die experimentellen Arbeiten
und die Abfassung des Manuskripts betreut.
Dafür danke ich. Für die tatkräftige Unterstützung der experimentellen Arbeiten und die
rege Diskussion der Ergebnisse danke ich den
Herren Dr. Mannhold und Dr. Rodenkirchen.
Für die Herstellung der Mikroelektroden und
der Abbildungen danke ich Frau S. Holzmann.

Inhaltsverzeichnis

I. Einleitung 2

II. Methoden und Material 7

III. Ergebnisse

A. Inotrope Effekte 9

a) Amplituden-Frequenzbeziehung 9

b) Amplituden-Pausenbeziehung 15

B. Elektrophysiologische Effekte

a) Plateauphase und Aktionspotentialdauer 18

b) Slow Responses 22

c) Wirkung auf den schnellen Natriumkanal 26

d) Bestimmung der Reizschwelle bei verschiedenen Reizfrequenzen 29

e) Bestimmung der relativen Refraktärzeit 33

f) Untersuchung am isolierten Sinusknoten 34

IV. Diskussion der Ergebnisse 38

V. Literaturverzeichnis 42

1. Einleitung

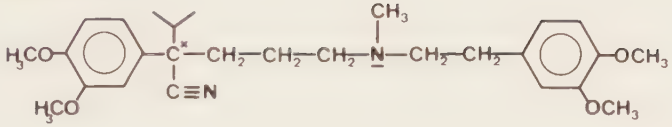
Tiapamil ist ein neues Antiarrhythmikum, das große chemische Verwandtschaft zu dem Kalziumantagonisten Verapamil aufweist (siehe Strukturformel in Abb. 1). Anstelle der Isopropyl-Seitenkette und der Zyanogruppe am α-C-Atom ist ein m-Dithian-Ring eingeführt worden, sodaß das α-C-Atom nicht mehr asymmetrisch substituiert ist.

Die inotropen und elektrophysiologischen Effekte des (±)Verapamil, (+)Verapamil und (-)Verapamil sind durch viele Untersuchungen belegt (BAYER et al. 1975 a, b, c; CRANEFIELD et al. 1974; EHARA und KAUFMANN 1978; KOHLHARDT et al. 1972; McCANS et al. 1974; NAWRATH et al. 1977; ROSEN et al. 1975). Eine stereospezifische bzw. stereoselektive Wirkung wurde beschrieben. So ist am Herzen die kalziumantagonistische Wirkung dem (-)Isomer und die lokalanästhetische Wirkung vorwiegend dem (+)Isomer zuzuschreiben (BAYER et al. 1975 b, c).

Stereospezifität und erst recht Stereoselektivität der Wirkung von Pharmaka wird im allgemeinen als Anzeichen für Wechselwirkung mit spezifischen Wechselwirkungspartnern (Rezeptoren) betrachtet (FORTH et al. 1975; HÖLTJE 1979). Dementsprechend können Veränderungen der molekularen Struktur eines Pharmakons in der Nähe eines asymmetrisch substituierten C-Atoms und erst recht der Verlust der optischen Aktivität zu einem Verlust der spezifischen Wirkung führen.

Es ergibt sich damit die Frage, ob die beschriebenen Molekülveränderungen im Tiapamil nur zu Affinitätsänderungen gegenüber den spezifischen Wechselwirkungsstrukturen für Verapamil geführt haben, oder ob die Veränderungen der Molekülstruktur so tiefgreifend sind, daß eine typische Verapamilwirkung nicht mehr zu beobachten ist.

Verapamil



Ro 11-1781

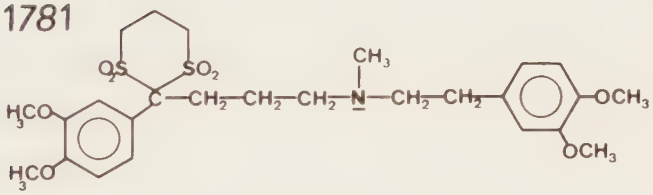


Abb. 1: Strukturformeln von Tiapamil (Ro 11-1781) und Verapamil

Erste experimentelle und klinische Befunde weisen darauf hin, daß Tiapamil kalziumantagonistische Wirkungen entfaltet. So zeigen Untersuchungen am isolierten Gefäßstreifen, daß der Kalziumeinstrom in die glatten Gefäßmuskelzellen dosisabhängig reduziert wird (THORENS und HAEUSLER 1978). Entsprechende Untersuchungen am isolierten Myokardpräparat liegen bislang nicht vor.

Am intakten, nicht narkotisierten Hund konnte andererseits gezeigt werden, daß Tiapamil (30 mg/kg KG p.o.) den Blutfluß in den Koronargefäßen und in der A.abdominalis stärker erhöht als dieselbe Dosis Verapamil (EIGENMANN et al. 1978). Im Gegensatz zu Verapamil veränderte Tiapamil den mittleren arteriellen Blutdruck nicht, es erhöhte jedoch leicht den linksventrikulären Druck und dp/dt. Dabei stieg die Herzfrequenz an, während Verapamil zuerst eine Tachykardie erzeugte, die von einer Bradykardie gefolgt war.

Diese Ergebnisse schließen einen direkt negativ inotropen Effekt von Tiapamil am Myokard nicht aus. Vielmehr können regulatorische sympathomimetische Aktivitäten die verapamilähnlichen Effekte verdecken. Diese Deutung wird vor allem durch die Erhöhung der Herzfrequenz nahegelegt.

In der Klinik führt Tiapamil bei Patienten mit Sinusrhythmus und bei gesunden Versuchspersonen zu einer Abnahme des mittleren arteriellen Blutdrucks bei nicht wesentlich veränderter Herzfrequenz (BISCHOFF et al. 1978; COCCO et al. 1979 b). BISCHOFF berichtet allerdings über eine Zunahme von Herzfrequenz und Auswurfleistung bei Blutdruckabfall, wobei auch er die ersteren Effekte als sympathotone Reaktion wertet.

Für manche Kalziumantagonisten wie z.B. Verapamil, Prenylamin und Diltiazem ist eine antiarrhythmische Wirkung nachgewiesen worden (HAAS et al. 1975; HUANG und PENG 1977; ROSEN et al. 1975; KAWAI et al. 1981; SINGH et al. 1978; WIT und CRANEFIELD 1974;

SINGH und WILLIAMS 1972), die mindestens zum Teil auf die kalzium-antagonistische Potenz dieser Substanzen zurückgeführt werden kann.

Allerdings ist eine kalziumantagonistische Wirkung einer Substanz nicht in jedem Fall mit einer antiarrhythmischen Wirkung verbunden. Als typisches Beispiel gilt Nifedipine, von dem bis heute eine antiarrhythmische Wirkung nicht beschrieben wurde.

Klinisch-elektrophysiologische Untersuchungen bestätigen übereinstimmend, daß Tiapamil eine verlängerte PQ-Zeit, bzw. eine verlängerte AH-Zeit im Hiss-Bündel-Elektrogramm verursacht (BRISSE et al. 1978; BISCHOFF et al. 1978; GMEINER et al. 1978, 1979; COCCO et al. 1979b). Dabei werden die intraatriale Leitungszeit und die HV-Zeit nicht verändert. Diese Befunde deuten auf den AV-Knoten als bevorzugten Wirkort des Tiapamil am Herzen hin.

COCCO et al. (1979) und GMEINER et al. (1978) berichten über eine AH-Verlängerung, die bei höherfrequenter Vorhofstimulation besonders ausgeprägt ist. Auch Wenckebach-Blockierungen traten unter diesen experimentellen Bedingungen bei niedrigeren Frequenzen auf als unter Kontrolle.

Bei gesundem Sinusknoten wird die Sinusknotenerholungszeit und die Sinuszyklusdauer nach hochfrequenter Vorhofstimulation durch Tiapamil nicht signifikant verändert (COCCO et al. 1979 b; GMEINER et al. 1978). Bei Patienten mit Sick-Sinus-Syndrom trat jedoch unter Pharmakonwirkung eine verlängerte Sinusknotenerholungszeit auf, wie dies auch für Verapamil beschrieben wurde (SEIPEL et al. 1974).

Wie Verapamil war auch Tiapamil besonders erfolgreich bei der Therapie supraventrikulärer Arrhythmien, die nach weitverbreiteter Meinung häufig durch ektopische Schrittmacher ausgelöst oder durch Reentry-Phänomene aufrechterhalten werden. Von letzteren wird angenommen, daß sie von langsamen Kalziumpotentialen getragen werden (CRANEFIELD et al. 1973).

Die vorliegende Arbeit soll klären, ob die Wirkungen von Tiapamil allein durch einen Kalziumantagonismus erklärt werden können, oder ob insbesondere für die antiarrhythmische Wirkung noch andere Pharmakoneffekte von Bedeutung sein könnten.

II. Methoden und Material

Die Untersuchungen wurden am Katzenpapillarmuskel ausgeführt. Zu diesem Zweck wurde von Katzen beiderlei Geschlechts unter leichter Äthernarkose das Herz entnommen. Nach Exzision geeigneter Papillarmuskeln (Durchmesser maximal 0,8 mm; Länge 6-8 mm) aus dem rechten Ventrikel, wurde das Präparat in ein Muskelbad gebracht, das von einer Tyrodelösung von 32° C mittels einer Rollerpumpe durchströmt wurde (30 ml/min).

Die Lösung wurde mit einem Gasgemisch aus 95 % 0_2 und 5 % CO_2 durchperlt. Sie hatte folgende Zusammensetzung (mM/l): NaCl 136,9; KCl 2,68; (15); $NaHCO_3$ 11,9; NaH_2PO_4 0,42; $CaCl_2$ 2,5; $MgCl_2$ 1,15; Glucose 10,0. Der pH betrug 7,2. Nach einer Einwirkdauer des Pharmakons von einer Stunde wurde mit den Messungen begonnen.

Bei der Ableitung der Aktionspotentiale wurde der Muskel mittels einer bipolaren Nadelelektrode stimuliert, die einen eindeutig definierten Reizort garantierte. Es wurden Rechteckreize von dreifacher Schwellenintensität und 0,2 ms Dauer (1 ms bei slow Responses) nach Reizisolation über einen photoelektrischen Koppler erdfrei appliziert. Für die intrazelluläre Ableitung der Membranpotentiale wurden die üblichen Glaskapillarelektroden verwendet mit einem Spitzendurchmesser von weniger als 1 µm. Ihr Widerstand betrug 20-30 MΩ.

Die Aktionspotentiale wurden verstärkt und zusammen mit der ersten Ableitung auf einem Speicheroszillographen dargestellt. Diese Bilder wurden photographiert und ausgewertet.

Für die Ermittlung der Reizzeit-Stromkurven und der relativen Refraktärzeit verwendeten wir zur Reizung des Muskels eine an der Spitze abgebrochene Mikroelektrode.

Die kontraktile Aktivität der Muskeln wurde durch Messung der Kontraktionsamplituden des isotonisch kontrahierenden Muskels erfaßt. Die Vordehnung betrug 0,7 p/mm². Die geringe Vordehnung und die isotonische Kontraktionsform ermöglicht eine länger andauernde stabile Aktivität der Präparate als unter isometrischen Bedingungen, da der O_2-Verbrauch mit der Kraft korreliert, gegen die der Muskel arbeitet.

Zur Vermeidung von Effekten der Erregungsausbreitungsgeschwindigkeit auf die Kontraktionsamplitude wurden die Muskeln mittels parallel neben dem Muskel angebrachter Ag/AgCl-Elektroden von 10 mm Länge und 1 mm Dicke stimuliert.

Bei Feldstimulation ergeben sich erhebliche Freisetzungen von Noradrenalin (BLINKS 1966). Durch Anwendung kurzer Reize wurde versucht, dies weitgehend zu vermeiden. Zusätzlich wurde den Versuchstieren 24 Stunden vor Versuchsbeginn 2 mg kg KG Reserpin subkutan verabreicht.

III. Ergebnisse

A. Inotrope Effekte

a) Amplituden-Frequenzbeziehung

In Abb. 2 A sind Originalregistrierungen von Kontraktionen eines isotonisch kontrahierenden Papillarmuskels wiedergegeben. Unter Kontrollbedingungen zeigt der Papillarmuskel nach einer abrupten Erhöhung der Reizfrequenz die seit BOWDITCH (1871) bekannte treppenförmige Zunahme der nachfolgenden Kontraktionen, wobei nach jeweils 10 bis 15 Schlägen ein neuer Gleichgewichtszustand erreicht wird. Nach der Einwirkung von Tiapamil in einer Konzentration von $2,5 \times 10^{-5}$ M/l bleibt die positive Treppe bei steigender Reizfrequenz erhalten. Die Kontraktionsamplituden sind über den gesamten untersuchten Frequenzbereich annähernd gleichmäßig verringert. Verglichen mit der Kontrollsituation findet sich bei f=6/min eine Abnahme der Kontraktionsamplitude um 6 % und bei f=60/min von 8 % (Mittelwerte). Es deutet sich eine leichte Frequenzabhängigkeit der Wirkung an, die jedoch bei dieser Konzentration statistisch nicht signifikant ist. Unter $2,5 \times 10^{-4}$ M/l treten im Gegensatz zur Kontrolle keine positiven sondern negative Treppen auf, die nach wenigen Schlägen einen neuen Gleichgewichtszustand erreichen. Die Abnahme der steady-state Kontraktionsamplituden beträgt hier bei f=6/min 33 % $\pm$ 3 % und bei f=60/min 61 % $\pm$ 2 % (Mittelwert $\pm$ Standardabweichung; Abb. 2 B).

Tiapamil ($2,5 \times 10^{-4}$ M/l) hemmt also die Kontraktionsamplitude bei hoher Stimulationsfrequenz stärker als bei niedriger. Dieses Wirkmuster entspricht im Prinzip der Wirkung des ($\pm$)Verapamil bzw. des (-)Verapamil.

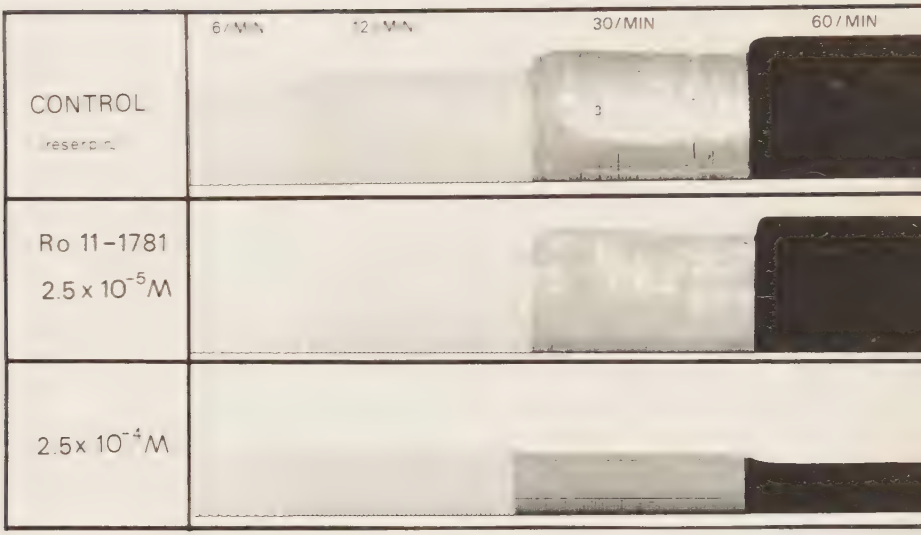


Abb. 2 A: Originalregistrierungen von Amplituden-Frequenzbeziehungen isotonisch kontrahierender Katzenpapillarmuskeln. Unter Kontrollbedingungen wird jede plötzliche Erhöhung der Reizfrequenz im Bereich von 6/min bis 60/min mit einer positiven Treppe beantwortet. Unter Einwirkung von $2,5 \times 10^{-5}$ M/l Tiapamil (Ro 11-1781) bleiben die positiven Treppen erhalten, die Kontraktionsamplituden sind annähernd gleichmäßig verringert. Bei höherer Konzentration ($2,5 \times 10^{-4}$ M/l) zeigt sich eine Umkehr der Amplituden-Frequenzbeziehung mit flachen monophasischen Treppen nach Frequenzanstieg. Bei f=6/min beträgt die Amplitudenreduktion 33 % ± 3 %, bei f=60 min 61 % ± 2 % gegenüber Kontrolle (Mittelwert ± Standardabweichung).

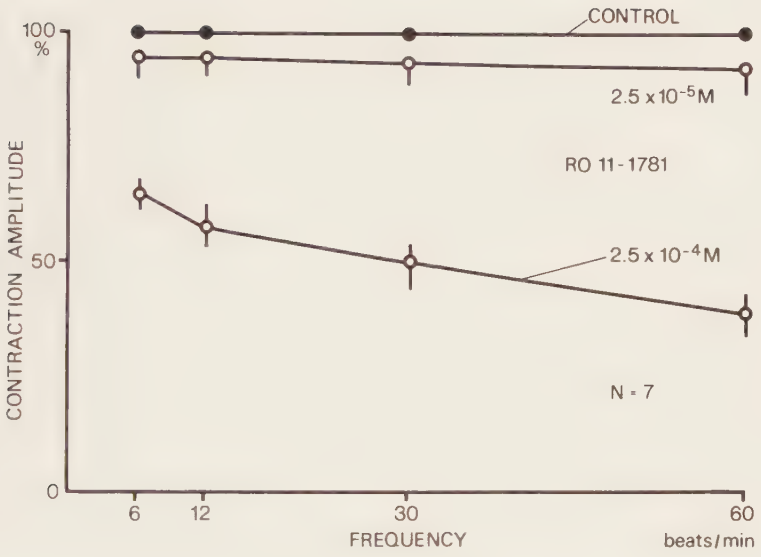


Abb. 2 B: Amplituden-Frequenzbeziehung isotonisch kontrahierender Katzenpapillarmuskeln. Experimenteller Ablauf entspricht den in Abb. 2 A gezeigten Originalregistrierungen. In Abhängigkeit von der Reizfrequenz (Abszisse) wurde im Bereich zwischen f=6/min und f=60/min die steady-state Kontraktionsamplitude unter Tiapamil (Ro 11-1781) gemessen. Sie wurde in Prozenten der unter Kontrollbedingungen bei den jeweiligen Frequenzen registrierten Amplituden (100 %) auf der Ordinate dargestellt.

Tabelle 1

Frequenzabhängigkeit der negativ inotropen Wirkung von Tiapamil im Vergleich mit spezifischen Kalziumantagonisten

	negativ inotrope Wirkung EC50 (M/l)		relative negativ inotrope Wirkung Verapamil= 1		Frequenzspezifität der negativ inotropen Wirkung
Reizfrequenz (min^{-1})	6	60	6	60	$\frac{EC50(f=6/min)}{EC50(f=60/min)}$
Tiapamil (Ro 11-1781)	$5,2 \times 10^{-4}$	$1,7 \times 10^{-4}$	0,37	0,02	3,1
(±)Verapamil	$1,9 \times 10^{-4}$	$3,5 \times 10^{-6}$	1,00	1,00	55,3
Diltiazem	$1,1 \times 10^{-4}$	$9,8 \times 10^{-6}$	1,73	0,36	11,2
Fendiline	$8,8 \times 10^{-5}$	$5,0 \times 10^{-5}$	2,15	0,07	1,76
(±)Prenylamin	$2,5 \times 10^{-5}$	$2,0 \times 10^{-5}$	7,60	0,18	1,25
Nifedipine	$6,1 \times 10^{-7}$	$5,1 \times 10^{-7}$	311,48	6,86	1,2

Die qualitative Wirkung des Tiapamil ist jedoch nicht völlig mit der des Verapamil identisch. Bei genauer Betrachtung der Übergänge nach Frequenzanstieg findet man kaum die bei Verapamil regelmäßig beobachtete biphasische Anpassung: eine schnelle negative Treppe, gefolgt von einem sehr langsamen Wiederanstieg der Kontraktionsamplituden (BAYER et al. 1975a;MANNHOLD et al. 1978; MANNHOLD et al. 1981). Unter der Wirkung von Tiapamil zeigen sich dagegen in den meisten Versuchen nur flache monophasische Übergänge. Nach Frequenzanstieg kommt es nur zu kurzdauernden negativen Treppen, die nach 6-8 Schlägen ein neues Gleichgewicht erreichen (Abb. 2 A).

Die quantitativen Unterschiede zeigt Tabelle 1. Dort sind die EC50-Werte für den negativ inotropen Effekt von Tiapamil den entsprechenden Werten spezifischer Kalziumantagonisten gegenübergestellt (RODENKIRCHEN et al. 1981). Von den aufgeführten Substanzen zeigt Tiapamil die schwächste negativ inotrope Wirkung, sowohl bei f=6/min als auch bei f=60/min. Im Vergleich zu Verapamil beträgt die negativ inotrope Potenz des Tiapamil bei f=6/min ungefähr 1/3, bei f=60/min nur 1/50.

Zur Charakterisierung der Frequenzabhängigkeit der negativ inotropen Wirkungen ist in Tabelle 1 als Maß für die Frequenzspezifität der Quotient EC50(f=6)/EC50(f=60) wiedergegeben. Die Quotienten sind dabei um so höher, je stärker die Pharmakonwirkung mit der Reizfrequenz zunimmt. Der Frequenzquotient von 3,1 zeigt, daß die Frequenzabhängigkeit des negativ inotropen Effekts von Tiapamil verglichen mit Verapamil (Quotient= 55,3) sehr gering ist.

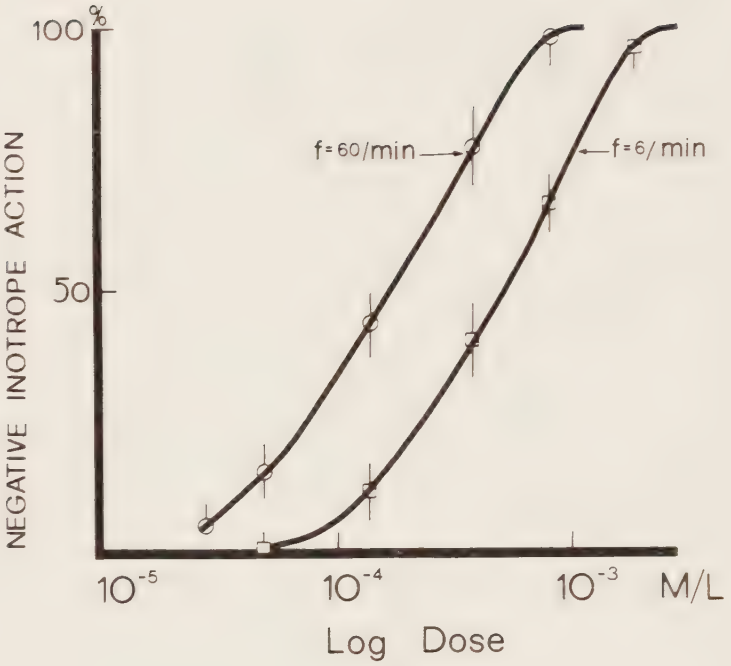


Abb. 3: Dosis-Wirkungs-Kurven der negativ inotropen Wirkung von Tiapamil (Ro 11-1781) am isotonisch kontrahierenden Katzenpapillarmuskel bei verschiedenen Frequenzen. Am Beispiel der Frequenzen f=6/min und f=60/min wird deutlich, daß die negativ inotrope Wirkung von Tiapamil frequenzabhängig ist.

Die Frequenzabhängigkeit der negativ inotropen Wirkung des Tiapamil ist demnach etwa 18-mal geringer als die des (±)Verapamil. Frequenzabhängigkeit der Wirkung bedeutet, daß für jede Reizfrequenz eine eigene Dosis-Wirkungs-Kurve existiert. Abb. 3 zeigt den negativ inotropen Effekt von Tiapamil am Beispiel der Frequenzen 6/min und 60/min.

b) Amplituden-Pausenbeziehung

Anhand der Amplituden-Pausenbeziehung konnte gezeigt werden, daß Verapamil neben seiner bekannten Hemmwirkung auf den langsamen Einwärtsstrom auch die Wiederverfügbarkeit intrazellulär gespeicherten Aktivator-Kalziums verzögert (BAYER et al. 1975 b).

Abb. 4 zeigt die Ergebnisse von entsprechenden Versuchen mit Tiapamil. Der Versuchsablauf ist im Inset der Abb. 4 wiedergegeben. Nach konditionierenden steady-state Kontraktionen (f=60/min) wurde ein Ruheintervall variabler Dauer eingelegt (TI), an dessen Ende eine einzige Kontraktion ausgelöst wurde. Die Amplitude dieser Kontraktion (AT) wurde als abhängige Variable von der Länge des Testintervalls (Abszisse) auf der Ordinate dargestellt. Dabei wurden alle Kontraktionsamplituden in Prozenten der steady-state Kontraktionsamplituden unter Kontrollbedingungen dargestellt.

Es ist heute allgemein anerkannt, daß die Höhe einer Einzelkontraktion nicht nur beim Skelettmuskel sondern auch am Myokard durch diejenige Menge an Aktivator-Kalzium bestimmt wird, die aus den Speichern des sarkoplasmatischen Retikulums (SR) freigesetzt werden kann (TRITTHART et al. 1973; BASSINGTHWAIGHTE und REUTER 1972; KAUFMANN et al. 1974). Eine einzelne Kontraktion wie AT spiegelt daher den aktuellen Füllungszustand des SR wieder (HOMBURGER et al. 1973; KAUFMANN et al. 1974).

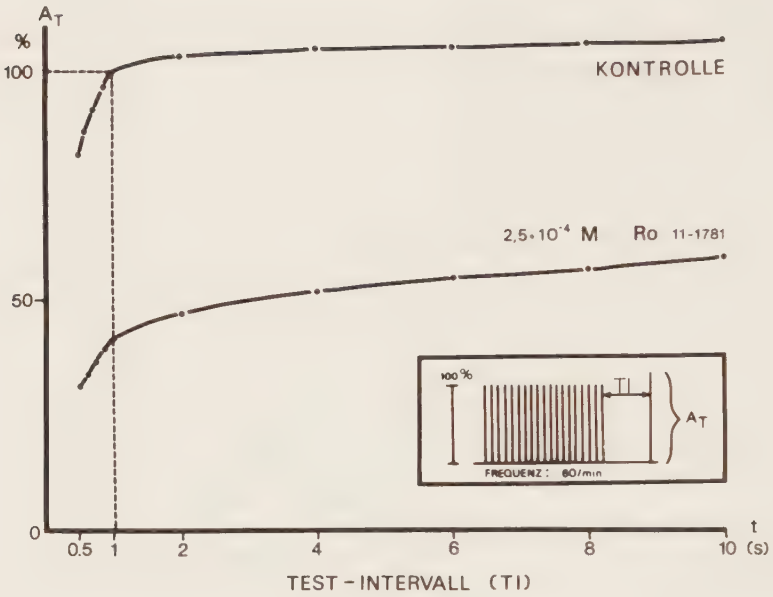


Abb. 4: Amplituden-Pausenbeziehung für einzelne Testkontraktionen des Katzenpapillarmuskels. Experimenteller Ablauf siehe Inset. Nach steady-state Kontraktionen (f=60/min) wurde die Reizung unterbrochen und nach variablen Testintervallen (TI) eine einzelne Kontraktion ausgelöst. Ihre Amplitude (AT) wurde gemessen und in Prozenten der entsprechenden Kontrollamplitude auf der Ordinate dargestellt. $2{,}5 \times 10^{-4}$ M/l Tiapamil (Ro 11-1781) verzögert die Wiederherstellung der Kontraktionsamplitude. Die Höhe der Kontrollamplitude wird auch nach langen Pausen nicht erreicht.

Es ist offensichtlich, daß dieser Restitutionsprozeß durch Tiapamil leicht verlangsamt wird (Abb. 4). Die Zeitkonstante wird von 0,4 (Kontrollbedingungen) auf 0,8 Sekunden unter Tiapamil ($2,5 \times 10^{-4}$ M/l) erhöht.

Verapamil in vergleichbarer negativ inotrop wirksamer Konzentration erhöht die Zeitkonstante auf etwa 3 Sekunden (BAYER et al. 1975 b). Im Hinblick auf die Amplituden-Pausenbeziehung ist dies bei Verapamil der dominierende Effekt.

Neben den quantitativen Unterschieden zu Verapamil ergeben sich unter der Wirkung von Tiapamil auch qualitative Unterschiede. Trotz des verzögerten Restitutionsprozesses erreicht die Amplitude der Testkontraktion (AT) unter der Wirkung von Verapamil wieder den Kontrollwert (BAYER et al. 1975 a). Im Gegensatz dazu reduziert Tiapamil ($2,5 \times 10^{-4}$ M/l) auch die Höhe der Kontraktionen, die nach Pausen von 10 Sekunden ausgelöst werden.

Damit muß angenommen werden, daß unter Tiapamil nicht nur der Restitutionsprozeß etwas langsamer abläuft, sondern auch der maximale Füllungszustand der intrazellulären Kalziumspeicher des SR vermindert ist.

B. Elektrophysiologische Effekte

a) Plateauphase und Aktionspotentialdauer

Es kann heute als gesichert gelten, daß im Myokard neben dem schnellen Natriumstrom ein zweiter, langsamer Einwärtsstrom fließt, der überwiegend von Kalziumionen getragen wird. Er trägt zur Ausbildung des Aktionspotentialsplateaus (Phase 2) bei (REUTER 1973).

Bei Substanzen, von denen man annimmt, daß sie den erregungsbedingten Kalziumeinwärtsstrom hemmen, wird dementsprechend erwartet, daß sie Veränderungen am Plateau des Aktionspotentials hervorrufen.

Ab. 5 und 6 zeigen Originalregistrierungen monophasischer Aktionspotentiale, die während repetitiver Reizung eines Katzenpapillarmuskels abgeleitet wurden. Abb. 5 zeigt, daß das Plateau unter Tiapamil ($2{,}5 \times 10^{-5}$ M/l) verglichen mit Kontrolle bei f=15/min verlängert ist. Bei höherer Dosierung verkürzt sich das Plateau bei f=90/min. Gleichzeitig nimmt es Dreiecksform an, ähnlich wie dies für Verapamil und sein Methoxyderivat (D 600) beschrieben wurde (BAYER et al. 1975 c; NAWRATH 1979, NAWRATH et al. 1977).

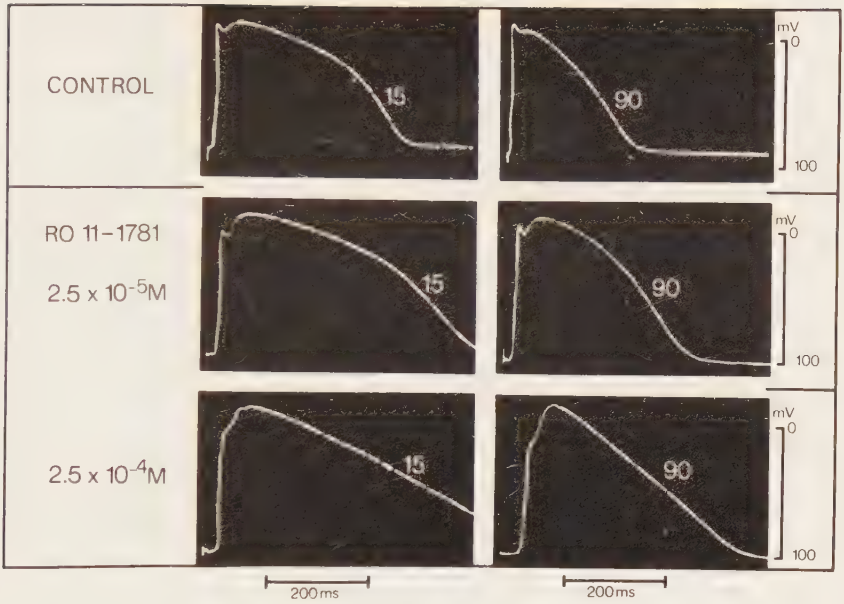


Abb. 5: Originalregistrierungen monophasischer Aktionspotentiale bei den Frequenzen 15/min und 90/min.
Folgende Effekte von Ro 11-1781 (Tiapamil) werden deutlich: Verlängerung des Plateaus bei f=15/min; Verkürzung des Plateaus bei f=90/min; Verlängerung der Repolarisationsphase, insbesondere bei f=15/min; Verlust des Overshoots bei 2,5 x 10^{-4} M/l; eine Erhöhung der Leitungszeit ist andeutungsweise sichtbar.

Die frequenzabhängige Verkürzung der Plateaudauer kann als frequenzabhängige Hemmung des transmembranären Kalziumeinwärtsstroms interpretiert werden. Diese bietet eine Erklärung für die ebenfalls frequenzabhängige negativ inotrope Wirkung von Tiapamil. Durch die Verminderung des Kalziumeinwärtsstromes wird die Speicherfüllung in Abhängigkeit von der Reizfrequenz reduziert. Dementsprechend ist bei hoher Frequenz vergleichsweise weniger Aktivator-Kalzium zur Freisetzung vorhanden.

Abb. 6 zeigt Originalregistrierungen eines anderen Experiments, bei dem die oben beschriebenen Effekte noch deutlicher sind. Der rechte Bildteil zeigt Aktionspotentiale, die nach plötzlichem Wechsel der Reizfrequenz fortlaufend auf dem Oszillographen gespeichert wurden.

Durch die Verlängerung des Aktionspotentials bei f=15/min einerseits und die Verkürzung bei f=90/min andererseits, nimmt die Regulationsbreite, innerhalb derer die Aktionspotentialdauer variiert werden kann, zu. Dieser Effekt ist insbesondere bei $2,5 \times 10^{-5}$ M/l deutlich sichtbar. Bei allen Versuchen war die Verlängerung der Aktionspotential-Gesamtdauer bei f=15/min stärker als bei f=90/min.

Es ist schwierig, eine eindeutige Interpretation dieses Phänomens zu geben. Einerseits könnte die stärkere Verlängerung der Aktionspotentialdauer bei niedriger Frequenz auf eine verlangsamte Inaktivierung der Kalziumleitfähigkeit der Membran hindeuten. Im Hinblick auf die negativ inotrope Wirkung wäre allerdings zu fordern, daß trotz verzögerter Inaktivierung des Kalziumeinwärtsstromes die Kalziumleitfähigkeit über andere Mechanismen vermindert ist.

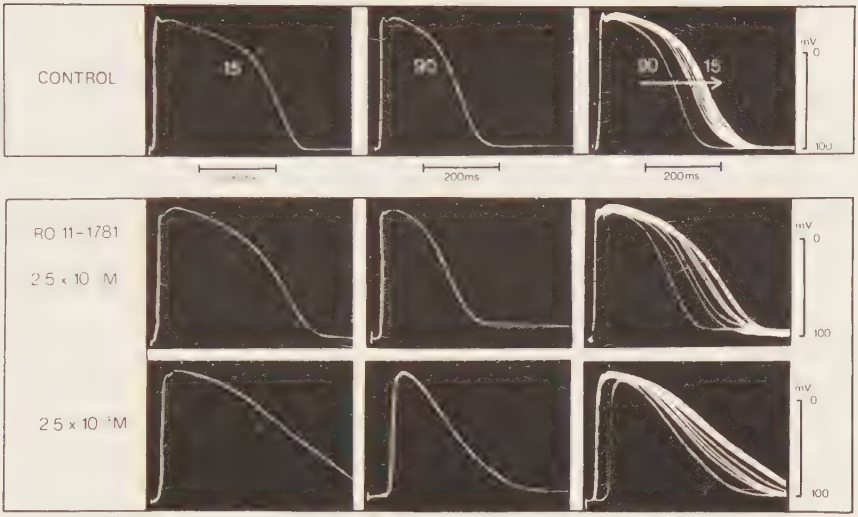


Abb. 6: Originalregistrierungen monophasischer Aktionspotentiale des Katzenpapillarmuskels bei den Frequenzen 15/min und 90/min. Besonders deutlich wird bei diesem Versuch die Verlängerung der Aktionspotentiale bei f=15/min (Tiapamil $2,5 \times 10^{-4}$), sowie die Verkürzung des Plateaus bei f=90/min. Im rechten Bildteil wurden die Aktionspotentiale nach Frequenzwechsel fortlaufend gespeichert. Dabei wurde das steady-state nach 4 Minuten als erreicht betrachtet. Die Zunahme der dynamischen Breite war hier bei $2,5 \times 10^{-5}$ M/l Tiapamil sehr deutlich. Gut erkennbar ist auch die Erhöhung der Leitungszeit.

Es ist vorstellbar, daß der Verminderung des Kalziumeinwärtsstroms durch eine Verzögerung der Inaktivierung langsamer Membrankanäle teilweise entgegengewirkt wird. Möglicherweise ist jedoch ein verzögerter oder verminderter Anstieg der Kaliumleitfähigkeit der Membran (g_K) für die Verlängerung der Aktionspotentiale verantwortlich. Dies könnte einmal durch eine direkte Hemmung der g_K geschehen, oder aber indirekt über eine Verminderung der intrazellulären Kalziumkonzentration. Es ist bekannt, daß g_K an verschiedenen erregbaren Membranen von der intrazellulären Kalziumkonzentration kontrolliert wird (ISENBERG 1975, 1977 a, b, c, d; KASS und TSIEN 1976).

So beschreibt ISENBERG (1977 d), daß beide Komponenten der Kaliumleitfähigkeit g_{K1} (zeitunabhängige Komponente) und die g_{K2} (zeitabhängige Schrittmacherkomponente) nach intrazellulären Kalzium-Injektion erhöht sind und nach Verminderung der intrazellulären Kalziumkonzentration durch Injektion von K-EGTA vermindert sind.

b. Slow Responses

Um die Wirkung von Pharmaka auf den langsamen Kalziumkanal zu untersuchen, bietet sich die Technik der Spannungsklemme an, bei der man die Ionenströme in Abhängigkeit vom Membranpotential und von der Zeit direkt messen kann. Für die Messung des langsamen Kalziumeinwärtsstromes muß man dabei das schnelle Natriumsystem ausschalten. Dies kann entweder dadurch geschehen, daß man die Natriumkanäle mit TTX blockiert oder durch Vordepolarisation der Membran auf etwa -45 mV das Natriumsystem inaktiviert.

Um erste orientierende Hinweise über den Effekt von Tiapamil auf den Kalziumeinwärtsstrom zu erhalten, wurde in der vorliegenden Arbeit eine einfache Methode zur Untersuchung des langsamen Einwärtsstromes angewendet. Hierbei wurde die Fähigkeit der Myokardmembran genützt, bei inaktiviertem Natriumsystem regenerative Aktionspotentiale zu bilden, die durch den langsamen Kalziumeinwärtsstrom getragen werden. Hierzu wurde das Membranpotential durch Zugabe von KCl in die Badlösung (12-16 mM/l) auf etwa -45mV reduziert. Die unter diesen Bedingungen auftretenden, regenerativ fortgeleiteten Aktionspotentiale (slow Responses) zeigen eine geringe Depolarisationsgeschwindigkeit, die im wesentlichen von der Kalziumleitfähigkeit abhängt (SURAWICZ 1974; CRANEFIELD et al. 1972).

Wie die Kontrollbedingungen zeigen (Abb. 7), beträgt die maximale Aufstrichgeschwindigkeit (MRD) der slow Responses noch etwa 1/10 der MRD normaler Aktionspotentiale. Die slow Responses zeigen normalerweise bei hoher Frequenz eine Verminderung sowohl der MRD als auch der Gesamtdauer. Dies läßt sich damit begründen, daß bei Steigerung der Reizfrequenz der Kalziumeinwärtsstrom pro Erregung abnimmt, was wahrscheinlich dadurch bedingt ist, daß durch eine Zunahme des intrazellulären Kalziums eine Verminderung des elektrochemischen Gradienten für das Kalzium eintritt (SIMURDA et al. 1976). Bekanntlich reagiert das Kalziumgleichgewichtspotential sehr sensibel, wenn die intrazelluläre Kalziumkonzentration z.B. durch Steigerung der Erregungsfrequenz ansteigt.

Unter dem Einfluß von Tiapamil zeigt sich bereits bei 10^{-7} M/l eine deutliche Reduktion der MRD und der Dauer der slow Responses gegenüber Kontrolle. Dieser Effekt war in allen Versuchen bei hoher Frequenz wesentlich stärker ausgeprägt. Nach Anwendung höherer Konzentrationen als 3×10^{-7} M/l konnten keine slow Responses mehr ausgelöst werden.

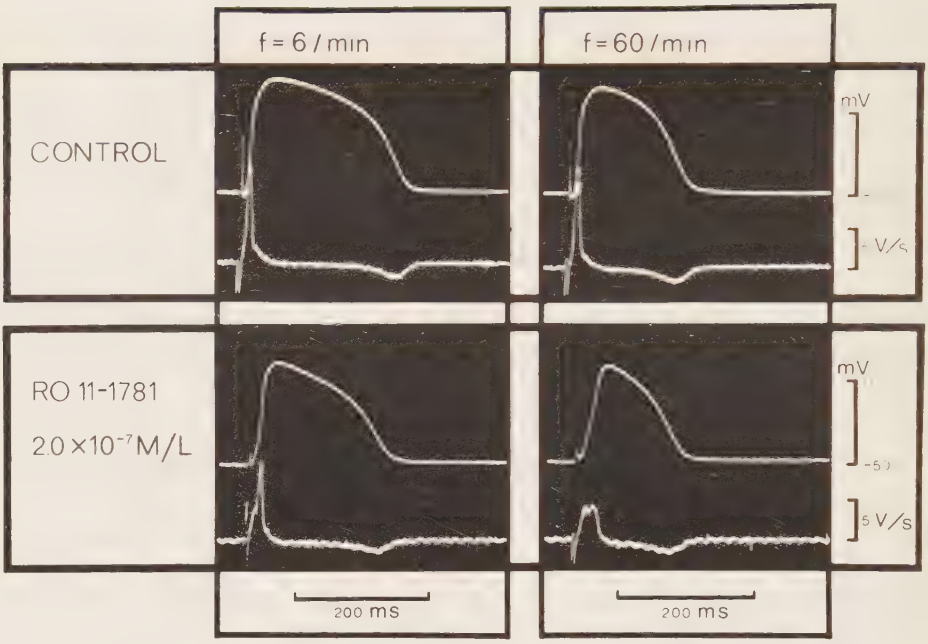


Abb. 7: Slow Responses des Katzenpapillarmuskels. Das Ruhepotential wurde durch Zugabe von KCl in die Badlösung (12-16 mM/l) auf etwa -45 mV reduziert. Unter der Wirkung von Ro 11-1781 (Tiapamil) in einer Konzentration von 2×10^{-7} M/l zeigt sich eine deutliche Reduktion der maximalen Depolarisationsgeschwindigkeit (untere Spur) und der Dauer. Beide Effekte zeigen Frequenzabhängigkeit. Besonders deutlich wird die MRD frequenzabhängig reduziert. (Verringerung der MRD bei f=60/min ungefähr um die Hälfte der MRD bei f=6/min).

Diese Ergebnisse weisen auf eine sehr empfindliche Hemmung des langsamen Einwärtsstromes hin, wobei die Wirkung bei f=60/min stärker ist als bei f=6/min.

Allerdings lassen sich bei der Ableitung von slow Responses keine eindeutigen Rückschlüsse auf die Natur des gehemmten Ionenstroms ziehen. REUTER (1979) weist darauf hin, daß bei den slow Responses auch Auswärtsströme eine Rolle spielen. So könnte prinzipiell ein Pharmakon, das die Auswärtsströme verstärkt, die MRD der slow Responses und deren Dauer reduzieren. Betrachtet man jedoch die Form normaler Aktionspotentiale unter Tiapamil (Abb. 5), so ergibt sich kein Hinweis für einen verstärkten Auswärtsstrom. Eher noch könnte man eine verminderte oder verzögert ansteigende Kaliumleitfähigkeit annehmen, da die finale Repolarisationsphase verzögert abläuft und zu einer Verlängerung der Aktionspotentiale führt.

Betrachtet man die sehr geringe Konzentration von Tiapamil, die eine vollkommene Suppression der slow Responses bewirkt, so sollte man beachten, daß die Fähigkeit der Membran zur Fortleitung regenerativer Aktionspotentiale in Form von slow Responses, bedingt durch die sehr geringe MRD, bereits kritisch ist. Schon geringe und unspezifische Veränderungen der Membraneigenschaften können zum Verlust der Fähigkeit zur regenerativen Fortleitung langsamer Kalziumpotentiale führen. Somit sind quantitative Aussagen über die Hemmung der Kalziumleitfähigkeit durch Tiapamil nur schwer möglich.

c) Wirkungen auf den schnellen Natriumkanal

Bei Registrierung der Aktionspotentiale mit der niedrigen Ablenkgeschwindigkeit von 50 ms/Skalenteil (siehe Abb. 5 und 6) läßt sich schon eine hemmende Wirkung von Tiapamil auf den schnellen Natriumeinwärtsstrom erkennen. Sie besteht in einer Abnahme der maximalen Depolarisationsgeschwindigkeit (MRD) und einem verminderten Overshoot. Dieser Effekt ist bei höherer Dosierung ($2{,}5 \times 10^{-4}$ M/l) und bei der höheren Reizfrequenz von 90/min besonders stark ausgeprägt. Die reduzierte MRD führt zu einer entsprechenden Verminderung der Fortleitungsgeschwindigkeit. Dies wird (bei konstantem Reizort und Ableitungsort der Mikroelektrode) durch die Verlängerung der Zeitspanne zwischen Reizartefakt und Beginn des schnellen Aufstrichs deutlich; (=Zunahme der Leitungszeit).

Die Abb. 8 und 9 zeigen in ihren rechten Bildteilen die Wirkung des Tiapamil auf den schnellen Aufstrich und die Aufstrichsgeschwindigkeit im Detail. Hierbei wurden die links dargestellten Aktionspotentiale gleichzeitig von einem zweiten Speicheroszillographen mit höherer Ablenkgeschwindigkeit aufgenommen. Zusätzlich wurde die Depolarisationsgeschwindigkeit als erste Ableitung (dV/dt) registriert (mittlere Spur).

In Abb. 8 sind exemplarisch Originalregistrierungen eines Versuchs dargestellt, bei dem nach repetitiver Reizung bei f=15/min ein abrupter Frequenzwechsel auf 90/min vorgenommen wurde, wobei die unmittelbar nachfolgenden Aktionspotentiale registriert wurden. Unter Kontrollbedingungen ändert sich die maximale Depolarisationsgeschwindigkeit (MRD) nach Frequenzwechsel nicht.

Unter Pharmakonwirkung ($2{,}5 \times 10^{-4}$ M/l) findet man eine deutliche Verminderung der MRD bei f=90/min. Tiapamil vermindert also frequenzabhängig die Amplitude des schnellen Aufstrichs und die MRD. Als Folge davon ist die Leitungszeit verlängert bzw. die Fortleitungsgeschwindigkeit der Aktionspotentiale verringert.

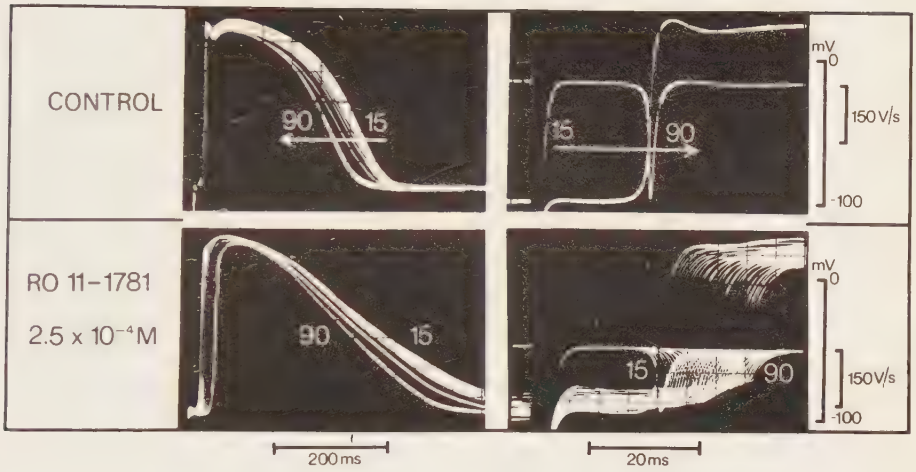


Abb. 8: Originalregistrierungen monophasischer Aktionspotentiale des Katzenpapillarmuskels bei den Frequenzen 15/min und 90/min. Die Frequenz wurde abrupt von 15/min auf 90/min erhöht. Im rechten Bildteil ist der schnelle Aufstrich (Phase 0) und die erste Ableitung (mittlere Spur) bei höherer Ablenkgeschwindigkeit dargestellt. $2,5 \times 10^{-4}$ M/l Tiapamil (Ro 11-1781) bewirkt eine stärkere Verminderung von Aufstrichsamplitude und Aufstrichsgeschwindigkeit bei f=90/min als bei f=15/min. Die Anpassung der MRD an die Frequenz f=90/min erfolgt in kleinen Schritten.

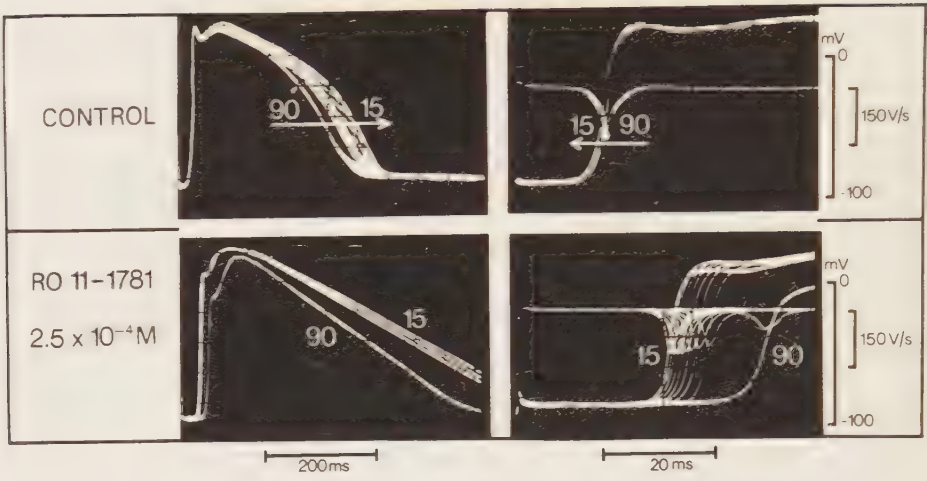


Abb. 9: Originalregistrierungen monophasischer Aktionspotentiale des Katzenpapillarmuskels bei den Frequenzen 15/min und 90/min. Die Frequenz wurde abrupt von 90/min auf 15/min gesenkt. Im rechten Bildteil ist der schnelle Aufstrich (Phase 0) und die Aufstrichsgeschwindigkeit (mittlere Spur) mit hoher Ablenkgeschwindigkeit dargestellt. Nach Registrierung der letzten steady-state Erregung bei f=90/min wurden fortlaufend die nachfolgenden Aktivierungen bei f=15/min registriert (Ro 11-1781= Tiapamil $2,5 \times 10^{-4}$ M/l).
Die Anpassung der MRD an die verminderte Frequenz erfolgt schneller und in größeren Schritten als bei Frequenzerhöhung. (Zum Vergleich siehe Abb. 8)

Einen ähnlichen Versuch zeigt die Abb. 9. Hierbei wurde jedoch nach repetitiver Reizung bei f=90/min die Frequenz schlagartig auf 15/min verringert, wobei acht der unmittelbar nachfolgenden Aktionspotentiale registriert wurden. Dabei erfolgt offensichtlich die Anpassung der Aufstrichsgeschwindigkeit an die veränderte Frequenz schneller als bei Frequenzsteigerung (Abb. 8).

Statistisch signifikante Aussagen über das Ausmaß der Wirkung auf die MRD ließen sich in unseren Versuchen nicht machen, da stabile, langdauernde Mikroelektrodeneinstiche an den kontraktil sehr aktiven Katzenpapillarmuskeln nur schwer zu erhalten sind. Das ändert nichts daran, daß die Frequenzabhängigkeit der Wirkung von Tiapamil auf den schnellen Natriumkanal in allen Versuchen qualitativ nachzuweisen war.

d) Bestimmung der Reizschwelle bei verschiedenen Reizfrequenzen

Tiapamil vermindert die MRD. Dies läßt den Schluß zu, daß Tiapamil lokalanästhetische Eigenschaften besitzt. Um quantitative Aussagen über die Stärke des lokalanästhetischen Effekts zu erhalten, wurden Reizzeit-Stromkurven aufgenommen. In Abb. 10A sind die Ergebnisse von 5 Versuchen dargestellt (Mittelwert $\pm$ Standardabweichung). Dabei wurde die benötigte Reizstromstärke (Ordinate) in Abhängigkeit von der Reizdauer (Abszisse) dargestellt. Da die Verminderung der MRD frequenzabhängig ist, wurden die Reizzeit-Stromkurven bei unterschiedlichen Frequenzen gewonnen.

Bei verschiedener Dauer der Rechteckreize, die mit einer Frequenz von 15/min, 60/min und 90/min appliziert wurden, wurde die jeweils geringstmögliche Stromstärke eingestellt, die gerade noch eine Erregung auslöste. Die Reizung erfolgte über eine abgestumpfte Mikroelektrode, um die Reizströme möglichst dicht und verlustfrei an die Membran zu bringen.

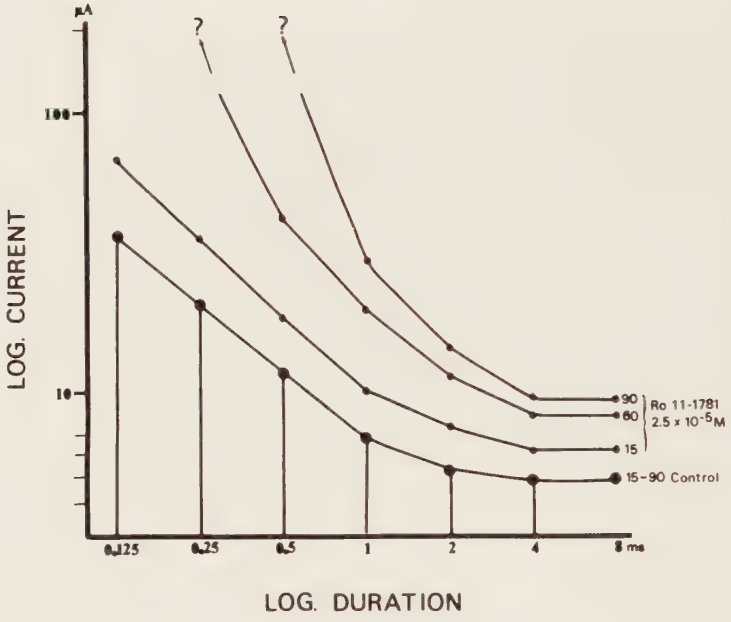


Abb. 10 A: Reizzeit-Stromkurven des Katzenpapillarmuskels unter der Wirkung von Tiapamil ($2,5 \times 10^{-5}$ M/l bei verschiedenen Frequenzen. Tiapamil (Ro 11-1781) erhöht die Reizschwelle. Dieser Effekt ist bei f=90/min stärker als bei f=15/min.

In Vorversuchen wurde ermittelt, daß eine Reizdauer von 8 ms zur Charakterisierung der Rheobasenstärke ausreicht. Eine weitere Verlängerung der Reizdauer brachte keine meßbare Verminderung der Reizstärke.
Die Reizzeit-Stromkurven in Abb. 10 A zeigen unter Kontrollbedingungen den bekannten hyperbolischen Verlauf. Sie zeigen keinen meßbaren Unterschied bei verschiedenen Frequenzen.

Tiapamil ($2,5 \times 10^{-5}$ M/l) erhöht die Rheobasenstärke. Diese Erhöhung der Reizstärke bei langen Reizdauern beträgt bei f=90/min ungefähr das Doppelte der unter Kontrolle gemessenen Rheobase. Die Chronaxie beträgt unter Tiapamil bei f=15/min 0,83 ms, bei f=60/min 1,33 ms und bei f=90/min 1,80 ms.

Zur Verdeutlichung der frequenzabhängigen lokalanästhetischen Wirkung des Tiapamil wurden die Reizzeit-Stromkurven linearisiert dargestellt. (Abb. 10 B). Diese Art der Darstellung erhält man, wenn man die Reizstromstärke (i) in Abhängigkeit vom Kehrwert der Reizdauer (t) aufträgt. Dabei geht die Hyperbel der Reizzeit-Spannungs-Beziehung (i - Rheobase) x t= C in die Gerade i= C x 1/t + Rheobase über. Bei dieser Darstellung zeigt sich bei langen Reizdauern ($1/t \longrightarrow 0$) die Rheobase als Schnittpunkt der Geraden mit der (i)-Achse. Die Konstante C ist das Maß für die Steigung der Geraden, wobei C jene Ladungsmenge darstellt, die die Membran zur Aktivierung des Erregungsprozesses benötigt.

Die Kontrollkurve in Abb. 10 B zeigt annähernd den Verlauf einer Geraden, d. h. C ist konstant. Der lineare Verlauf bestätigt damit, daß die experimentell gewonnene Reizzeit-Stromkurve unter Kontrollbedingungen durch die angegebene Formel gut approximiert werden kann.

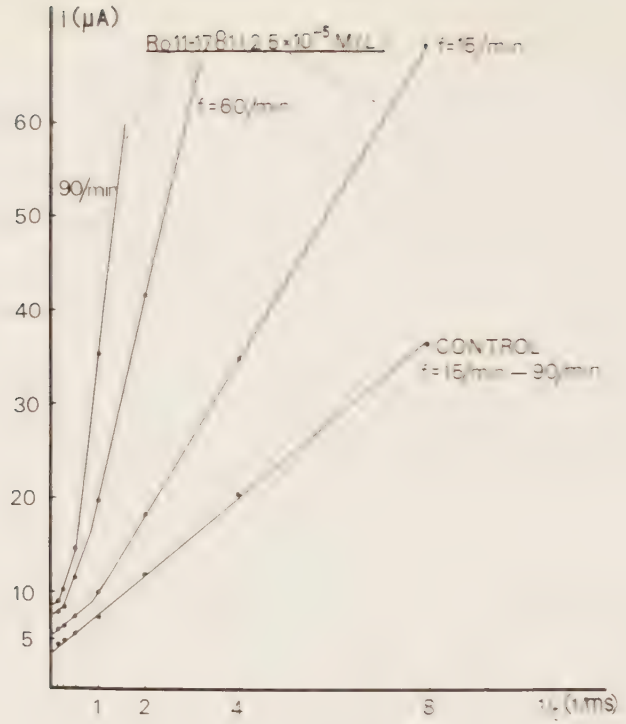


Abb. 10 B: Darstellung der Reizzeit-Stromkurven aus Abb. 10 A in linearisierter Form. Ausgehend von der Tatsache, daß die experimentell gefundenen Reizstromstärken (i) bei gegebener Reizdauer (t) unter Kontrollbedingungen annähernd auf einer Kurve der Form (i-Rheobase) x t= C liegen (Hyperbel), ergeben sich bei Auftragen der Stromwerte i (Ordinate) gegen 1/t (Abszisse) Geraden der Form i= C x 1/t + Rheobase. Dabei ergibt sich die Rheobase als Schnittpunkt der Geraden unter Kontrollbedingungen mit der Ordinate. Die Steigung C stellt die zusätzliche Ladungsmenge bei Verkürzung der Reizdauer dar, die zur Aktivierung der Membran benötigt wird. Ro 11-1781 (Tiapamil) erhöht die Rheobase bei hoher Frequenz mehr als bei niedriger Frequenz. Zusätzlich werden bei Verkürzung der Reizdauern höhere Ladungsmengen benötigt als unter Kontrollbedingungen. Auch dieser Effekt ist frequenzabhängig.

Es ist offensichtlich, daß Tiapamil den Verlauf der Reizzeit-Stromkurven bei höheren Frequenzen nicht nur zu höheren Rheobasenstärken parallel verschiebt. Dies trifft annähernd nur bei langen Reizdauern zu. Bei kürzeren Reizdauern jedoch weichen die Kurven im Gegensatz zur Kontrollkurve vom Verlauf einer Hyperbel der Form (i-Rheobase) x t= C ab. Vielmehr vergrößert sich C bei kurzen Reizdauern um so mehr, je höher die Reizfrequenz ist. So benötigt die Membran z.B. bei f=90/min und 1 ms Reizdauer das 3 1/2 -fache der entsprechenden Stromstärke bei f=15/min, wobei die Rheobase bei f=90/min nur das 1 1/2-fache der Rheobasenstärke bei f=15/min beträgt.

e) Bestimmung der relativen Refraktärzeit

Abb. 11 zeigt die Ergebnisse eines repräsentativen Versuchs, bei dem die Wirkung von Tiapamil auf die Erregbarkeit der Myokardmembran unmittelbar nach abgelaufener Aktivierung untersucht wurde.

Ausgehend von einer Grundfrequenz (15/min) wurde die Reizstärke für die Auslösung einer vorzeitig einfallenden Erregung (ES) gemessen. Dabei wurde der Papillarmuskel mit Rechteckreizen von 1 ms Dauer repetitiv stimuliert. Nach jeweils 8 Schlägen (f=15/min) wurde eine Extrasystole ausgelöst, wobei das ES-Intervall schrittweise verkürzt wurde. Zur Charakterisierung des Refraktärverhaltens der Membran wurde in Abb. 11 die Höhe des Reizstromes für die Auslösung einer Extrasystole (Ordinate) in Abhängigkeit vom Zeitintervall zwischen regulärem Stimulus und Extrastimulus dargestellt (Abszisse).

Unter Kontrollbedingungen bleibt der Reizbedarf bei Verkürzung des ES-Intervalls von 4 Sekunden auf 1 Sekunde konstant. Bei Verkürzung des ES-Intervalls unter 1 Sekunde ändert sich der flache Verlauf der ES-Intervall-Stromkurve und bildet bei Intervallen zwischen 0,8 Sekunden und 0,5 Sekunden eine deutliche Senke.

Bei ES-Intervallen innerhalb dieser Zeitspanne ist die erforderliche Reizstärke gegenüber allen möglichen längeren oder kürzeren ES-Intervallen deutlich vermindert. Diese Phase wird allgemein als supranormale Phase bezeichnet. Innerhalb der supranormalen Phase führen bereits geringere als Rheobasenstromstärken zu fortgeleiteter Erregung. Bei Verkürzung des ES-Intervalls unter 0,5 Sekunden erhöht sich die benötigte Stromstärke, wie dies für die relative Refraktärphase typisch ist. Die Kurve verläuft steil zu höheren Stromstärken. Geringfügige Verkürzungen der ES-Intervalle führen in diesem Bereich schnell zur Unerregbarkeit der Membran, d.h. die absolute Refraktärzeit wird erreicht.

Unter der Wirkung von Tiapamil ($2,5 \times 10^{-5}$ M/l) verläuft die Kurve der Reizstromstärke bei ES-Intervallen zwischen 1 Sekunde und 4 Sekunden etwa paraellel zur Kontrollkurve und gering zu höheren Reizstärken verschoben. Eine supranormale Phase wie unter Kontrollbedingungen ist bei etwa 0,7 Sekunden ES-Intervall nur angedeutet. Bei ES-Intervallen kleiner als 0,6 Sekunden steigt der Reizbedarf steil an. Unerregbarkeit der Membran wird bei ES-Intervallen erreicht, die etwa 140 ms länger sind als das entsprechende ES-Intervall unter Kontrolle. Die absolute Refraktärzeit und die relative Refraktärzeit ist also unter Tiapamil durchschnittlich um etwa 140 ms länger als unter Kontrolle.

f) Untersuchung am isolierten Sinusknoten

In 5 Versuchen wurde an spontan schlagenden Vorhöfen die Frequenz unter der Wirkung von Tiapamil gemessen. Dabei ergab sich die in Abb. 12 dargestellte Dosis-Wirkungs-Kurve. Die Wirkung wurde in Prozenten der Ausgangsfrequenz dargestellt. Die EC 50 beträgt $1,3 \times 10^{-6}$ M/l. Sie ist damit etwa 20-200 mal geringer als die EC50 für den negativ inotropen Effekt am Papillarmuskel.

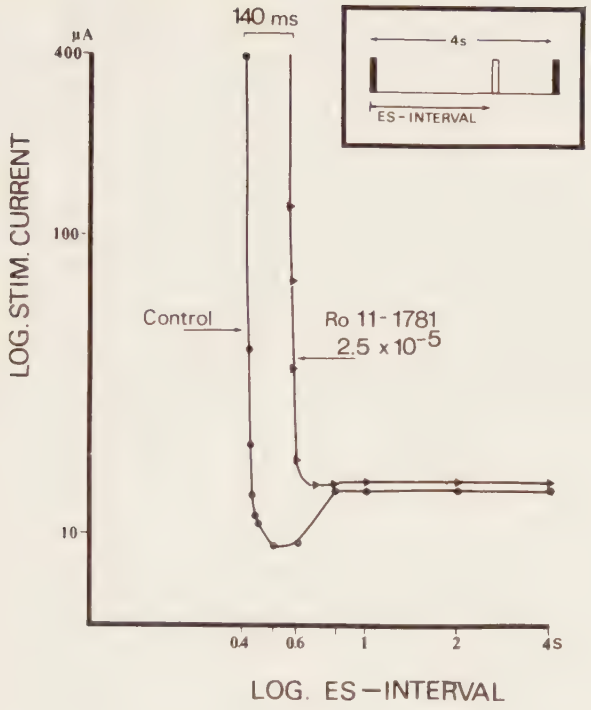


Abb. 11: Bestimmung der relativen und absoluten Refraktärzeit am Katzenpapillarmuskel unter der Wirkung von Tiapamil (Ro 11-1781), ($2{,}5 \times 10^{-5}$ M/l). Versuchsablauf siehe Inset. Ausgehend von der Grundfrequenz 15/min wurde nach jeweils 8 Aktivierungen ein Extrastimulus zwischen die regelmäßigen Schläge interponiert. Der Zeitabstand zwischen regulärem Stimulus und Extrastimulus wurde als ES-Intervall auf der Abszisse dargestellt. Zu jedem ES-Intervall wurde die erforderliche Stromstärke gesucht, die eine fortgeleitete Erregung hervorrief (Ordinate). Tiapamil beseitigt praktisch die supranormale Phase. Im ansteigenden Teil der Kurven befindet man sich in der relativen Refraktärphase (höhere als diastolische Reizstärken erforderlich). Der ansteigende Teil der Kurve unter Tiapamil ist ungefähr 140 ms parallel zur Kontrollkurve verschoben. Im oberen Teil des ansteigenden Kurvenasts (fast senkrechter Verlauf) ist die absolute Refraktärzeit erreicht.

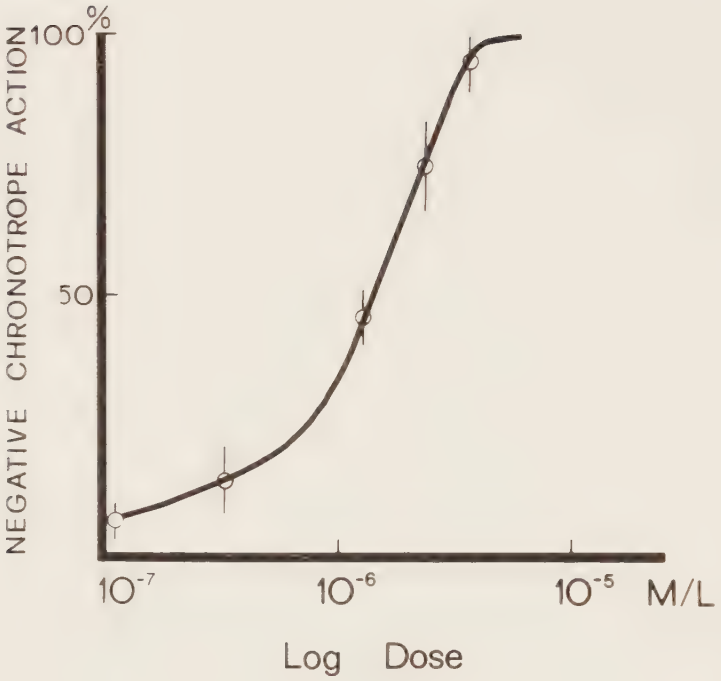


Abb. 12: Dosis-Wirkungs-Kurve der negativ chronotropen Wirkung von Tiapamil (Ro 11-1781) am spontan schlagenden isolierten Vorhof des Katzenherzens. EC50 = 1,3 x 10^{-6} M/l.

Unter der Einwirkung des Pharmakons schlugen die Vorhöfe trotz Frequenzabnahme zunächst regelmäßig. Erst bei einer Frequenzreduktion von 40-50 % traten unregelmäßige Aktivierungen auf. Die weitere Wirkung von Tiapamil war dann stark abhängig von der Einwirkzeit. Traten beispielsweise nach 1 Stunde unregelmäßige Entladungen auf, so konnte ein Sinusknotenstillstand auch ohne Konzentrationserhöhung erzeugt werden, wenn die Einwirkzeit auf 2-3 Stunden verlängert wurde.

Die in der Dosis-Wirkungs-Kurve angegebene Wirkung wurde jeweils nach 1 Stunde Einwirkzeit abgelesen.

IV. Diskussion der Ergebnisse

Wie die Ergebnisse zeigen, hat Tiapamil im Vergleich zu Verapamil und anderen spezifischen Kalziumantagonisten (Tabelle 1) eine sehr schwache negativ inotrope Wirkung. Ähnlich wie unter Verapamil bewirkt Tiapamil in höheren Konzentrationen ($2,5 \times 10^{-4}$ M/l) eine Umkehr der Amplituden-Frequenzbeziehung bei Fehlen der für Verapamil typischen biphasischen Treppen. Beide Substanzen verlangsamen die Restitutionskinetik des SR. Tiapamil vermindert jedoch die Höhe der Testkontraktion 10 Sekunden nach vorhergehender repetitiver Stimulierung, Verapamil hingegen nicht. Dieser Effekt deutet an, daß Tiapamil die im SR gespeicherte Kalziummenge vermindert, jedoch die Prozesse, die die Wiederverfügbarkeit des Aktivator-Kalziums kontrollieren, in ihrer Kinetik nur wenig beeinflußt.

Es liegt nahe, für den geringen negativ inotropen Effekt eine erhebliche Abnahme der Affinität zu den Wechselwirkungspartnern des Verapamil und verwandter Substanzen anzunehmen. Eine andere Erklärung besteht darin, daß Tiapamil über unspezifische Wirkungen zu einer geringen Verminderung der Inotropie führt. Beide Erklärungen müssen jedoch in Betracht ziehen, daß die Amplituden-Frequenzbeziehung umgekehrt wird. Somit ist bei höherer Reizfrequenz eine stärkere Wirkung auf die spezifischen oder unspezifischen Wechselwirkungspartner anzunehmen.
Die vergleichsweise hohe Empfindlichkeit der slow Responses gegen Tiapamil (10^{-7} bis 3×10^{-7} M/l) steht in einem Widerspruch zur geringen negativ inotropen Wirkung, die bei dieser geringen Konzentration nicht meßbar war. Da unter den Ableitbedingungen der slow Responses die Ausbildung regenerativ fortgeleiteter Aktionspotentiale ohnehin kritisch ist, bedarf es unter Umständen nur geringer Hemmwirkung auf den langsamen Kanal, um einen völligen Ausfall der Erregungsleitung in Form regenerativer slow Responses zu erzeugen.

Dies mag auch der Grund dafür sein, warum Kalziumantagonisten wie Verapamil bereits in sehr niedrigen Konzentrationen antiarrhythmisch wirksam sind, ohne die Kontraktionskraft des Herzens meßbar zu vermindern. So können Arrhythmien koupiert werden, die über Reentry-Phänomene aufrecht erhalten werden, bzw. können ektopische Schrittmacher unterdrückt werden, wie sie im geschädigten Myokard in teildepolarisierten Zonen entstehen. Bei der Entstehung und Aufrechterhaltung beider Arten von Herzrhythmusstörungen wird eine Beteiligung langsamer Potentiale angenommen (CRANEFIELD et al. 1974).

Ob bei der Verminderung der MRD der slow Responses außer Kalziumströmen möglicherweise auch die Zunahme auswärtsgerichteter Kaliumströme eine Rolle spielen, kann nicht endgültig entschieden werden (REUTER 1973). Jedoch spricht die Verzögerung der finalen Repolarisationsphase der normalen Aktionspotentiale unter Tiapamil (siehe Abb. 5) eher für eine Verminderung der Kaliumleitfähigkeit. Würden Kaliumauswärtsströme die MRD der slow Responses vermindern, so wäre im Hinblick auf das verminderte Ruhepotential der slow Responses zu fordern, daß die g_K zwischen -45mV und etwa +20 mV erhöht ist, daß aber bei Potentialen im Bereich der finalen Repolarisation normaler Aktionspotentiale unter Tiapamil (negativ -45 mV) die g_K vermindert ist. Interessant sind in diesem Zusammenhang die Versuche ISENBERGs (1977 c), der durch intrazelluläre Injektion von K-EGTA (Kalzium-Komplexbildner) eine deutliche Abflachung der normalerweise N-förmigen steady state ($I-V_m$)-Beziehung beobachtete, die qualitativ den geforderten Annahmen entspricht: wenig verminderte g_K bei Potentialen positiver -40 mV, verminderte g_K bei Potentialen negativer -40 mV.

Wenn unsere Annahmen zutreffen, müßten sich bei Voltage-Clamp-Untersuchungen unter der Wirkung von Tiapamil ähnlich abgeflachte steady-state ($I-V_m$)-Beziehungen zeigen.

In unserer Untersuchung verzichteten wir auf die Anwendung von Adrenalin zur Verstärkung der slow Responses. Dieses Pharmakon erhöht zwar die Kalziumleitfähigkeit über eine Zunahme verfügbarer Kalziumkanäle und der MRD der slow Responses. Es lassen sich jedoch nur schwer konstante Adrenalinkonzentrationen während der bei Tiapamil notwendig langen Einwirkzeit einstellen, da Adrenalin sehr schnell oxidiert wird.

Neben den kalziumantagonistischen Wirkungen läßt sich für Tiapamil auch eine deutliche lokalanästhetische Wirkung nachweisen. Sie zeigt sich in einer Verminderung der MRD der Aktionspotentiale sowie einer Reduzierung des Overshoot. Beide Effekte waren in unseren Versuchen frequenzabhängig. Die dementsprechend ebenfalls frequenzabhängige Erhöhung der Reizschwelle sowie die Ergebnisse bei der Bestimmung der relativen Refraktärzeit sind Anzeichen dafür, daß Tiapamil die recovery from inactivation des schnellen Natriumsystems verzögert oder in Form einer use-dependence in Wechselwirkung mit dem schnellen Natriumkanal tritt (siehe auch Abb. 8 und 9).

Allerdings sind die benötigten Pharmakonkonzentrationen zur Erreichung eines lokalanästhetischen Effekts mit $2{,}5 \times 10^{-5}$ M/l bis $2{,}5\ 10^{-4}$ M/l recht hoch. Eine Aussage, ob dieser lokalanästhetische Effekt zur antiarrhythmischen Potenz beiträgt, kann noch nicht endgültig gemacht werden. Möglicherweise ist die Kombination beider Effekte Voraussetzung für eine hohe antiarrhythmische Potenz.

Die Verlängerung der Aktionspotential-Gesamtdauer, insbesondere der finalen Repolarisation unter Tiapamil führt zu einer Verlängerung der absoluten und der relativen Refraktärzeit. Diese Verlängerung der Aktionspotentiale könnte entweder über eine direkte Wirkung von Tiapamil auf die Kaliumleitfähigkeit erfolgen, oder aber indirekt über eine Verminderung des intrazellulären Kalziums. Interessant ist in diesem Zusammenhang, daß

durch die verlängerte Refraktärzeit unter Tiapamil die unter Kontrolle vorhandene supranormale Phase nicht mehr beobachtet werden kann.

Die Untersuchungen am isolierten Sinusknoten zeigen einen negativ chronotropen Effekt. Die Aussagen zu einem Wirkungsmechanismus müssen spekulativ bleiben, da keine Mikroelektrodenuntersuchungen ausgeführt wurden.

Auffällig ist aber, daß die negativ chronotrop wirksame Konzentration nur wenig höher (Faktor 6-10) lagen als die zur Hemmung der slow Responses.

Da das maximale diastolische Potential im Sinusknoten normalerweise -50 mV bis -60mV beträgt, kann man annehmen, daß das schnelle Natriumsystem zum Teil inaktiviert ist. Sowohl ein schwacher lokalanästhetischer Effekt als auch die Hemmwirkung von Tiapamil auf den transmembranären Kalziumeinwärtsstrom könnten unter diesen Bedingungen auf die Zellen des Sinusknoten negativ chronotrope Wirkung ausüben. Da beide Effekte eine Abhängigkeit von der Frequenz aufweisen, wäre es denkbar, daß unter der Wirkung von Tiapamil zuerst jene Schrittmacherzellen im Sinusknoten gehemmt werden, die die schnellste Entladungsfrequenz aufweisen. Entsprechend würde immer jene Gruppe in der Hierarchie der Schrittmacherzellen gehemmt, die die relativ höchste Entladungsfrequenz aufweist.

BASSINGTHWAIGHTE, J.B., REUTER, H. (1972)
Calcium movements and excitation-contraction coupling in cardiac cells.
In: Electrical phenomena in the heart. pp. 353-395, ed. W.C. de MELLO, Academic Press: London - New York

BAYER, R., HENNEKES, R., KAUFMANN, R., MANNHOLD, R. (1975)
Inotropic and electrophysiological actions of verapamil and D 600 in mammalian myocardium I. Pattern of inotropic effects of the racemic compounds.
Naunyn Schmiedebergs Arch. Pharmacol. 290, 49-68

BAYER, R., KAUFMANN, R., MANNHOLD, R. (1975)
Inotropic and electrophysiological actions of verapamil and D 600 in mammalian myocardium II. Pattern of inotropic effects of the optical isomers.
Naunyn Schmiedebergs Arch. Pharmacol. 290, 69-80

BAYER, R., KALUSCHE, D., KAUFMANN, R., MANNHOLD, R. (1975)
Inotropic and electrophysiological actions of verapamil and D 600 in mammalian myocardium III. Effects of the optical isomers on transmembrane action potentials.
Naunyn Schmiedebergs Arch. Pharmacol. 290, 81-98

BISCHOFF, K.O., HAGER, W., FLOHR, E., HEREDIA, D. (1978)
Die Beeinflussung systolischer und elektrokardiographischer Zeitintervalle herzgesunder Patienten durch den Kalzium-antagonisten Ro 11-1781.
Z. Kardiol. 67, 268-272

BLINKS, J.R. (1966)
Field stimulation as mean of effecting the graded release of autonomic transmitters in isolated heart muscle.
J. Pharmacol. Exp. Ther. 151, 221-235

BOWDITCH, H.P. (1871)
Über die Eigenthümlichkeiten der Reizbarkeit, welche die Muskelfasern des Herzens zeigen.
Ber. sächs. Ges. (Akad.) Wiss. 652-689

BRISSE, B., BENDER, F., GÜLKER, H., NIEHUES, H. (1978)
Behandlung der absoluten Tachyarrhythmie bei Vorhofflimmern mit dem neuen Kalziumantagonisten Ro 11-1781.
Z. Kardiol. 67, 609-611

COCCO, G., STROZZI, C., CHU, D. (1979 b)
Human electropharmacology of the calcium antagonist Dimeditiapramine (Ro 11-1781) in coronary patients.
Clin. Cardiol. 2, 212-216

CRANEFIELD, P.F., WIT, A.L., HOFFMAN, B.F. (1972)
Conduction of the cardiac impulse. III. Characteristics of very slow conduction.
J. gen. Physiol. 59, 227-246

CRANEFIELD, P.F., WIT, A.L., Hoffman, B.V. (1973)
Genesis of cardiac arrhythmias.
Circulation 47, 190-204

CRANEFIELD, P.F., ARONSON, R.S., WIT, A.L. (1974)
Effect of verapamil on the normal action potential and on a calcium-dependent slow respons of canine cardiac Purkinje fibers.
Circ. Res. 34, 204-213

EHARA, T., KAUFMANN, R. (1978)
The voltage- and time-dependent effects of (-)verapamil on the slow inward current in isolated cat ventricular myocardium.
J. Pharmacol. Exp. Ther. 207, 49-55

EIGENMANN, R., GEROLD, M., HAEUSLER, G. (1978)
Cardiovascular effects of calcium antagonists in chronically instrumentes conscious dogs. Experientia 34, 923

FORTH, W., HENSCHLER, D., RUMMEL, W. (1975)
Allgemeine und spezielle Pharmakologie und Toxikologie
Bibliographisches Institut AG, Zürich, S. 23

GMEINER, R., NG, C.K., GSTÖTTNER, C., SCHWENNINGER, C. (1978)
Die Wirkung eines neuen Kalziumantagonisten (Ro 11-1781) bei supraventrikulären paroxysmalen Tachykardien.
Adv. Clin. Pharmacol. 16, 81-102

GMEINER, R., NG, C.K., SIMMA, H., GSTÖTTNER, M. (1979)
The effect of a new calcium antagonist (Ro 11-1781) on the cardiac conduction system in man.
Eur. J. Cardiol. 9, 77-86

HAAS, H.G., KERN, R., BENNINGER, CH., EINWÄCHTER, H.M. (1975)
Effects of prenylamine on cardiac menbrane currents and contractility.
J. Pharmacol. Exp. Ther. 192, 688-701

HÖLTJE, H.D. (1979)
Anwendung der MO-Methode zur Aufklärung von Arzneimittelwirkungsmechanismen.
Dtsch. Apotheker Z. 119, 793-799

HOMBURGER, H., SCHLEIERMACHER, W., ANTONI, H. (1973)
Time course of postextrasystolic potentation in isolated atrial and ventricular myocardium of guinea-pig as influenced by changes in frequency, in calcium, and by caffeine.
Pflügers Arch., Suppl. 339, R 5

HUANG, T.F., PENG, Y.I. (1977)
Effect of verapamil on experimental arrhythmias.
Eur. J. Pharmacol. 42, 363-370

ISENBERG, G. (1975)
Is potassium conductance of cardiac Purkinje fibres controlled by $(Ca)_i$?
Nature 253, 273-274

ISENBERG, G. (1977 a)
Cardiac Purkinje fibres. Resting, action, and pacemaker potential under the influence of $(Ca)_i$ as modified by intracellular injection technique.
Pflügers Arch. 371, 51-59

ISENBERG, G. (1977 b)
Cardiac Purkinje fibres. The slow inward current component under the influence of modified $(Ca)_i$.
Pflügers Arch. 371, 61-69

ISENBERG, G. (1977 c)
Cardiac Purkinje fibres. $(Ca)_i$ controls steady state potassium conductance.
Pflügers Arch. 371, 71-76

ISENBERG, G. (1977 d)
Cardiac Purkinje fibres. $(Ca)_i$ controls the potassium permeability via the conductance components g_{K1} and $\bar{g}_{K2}$.
Pflügers Arch. 371, 77-85

KASS, R.S., TSIEN, R.W. (1976)
Control of action potential duration by calcium ions in cardiac Purkinje fibers.
J. gen. Physiol. 67, 599-617

KAUFMANN, R. (1977)
Differenzierung verschiedener Kalzium-Antagonisten.
Münch. med. Wschr. 119, Suppl. 1, 6-11

KAUFMANN, R., BAYER, R., FÜRNISS, H., KRAUSE, H., TRITTHART, H. (1974)
Calcium-movement controlling cardiac contractility II. Analog computation of cardiac excitation-contraction coupling on the basis of calcium kinetics in a multi-compartment model.
J. Mol. Cell Cardiol. 6, 543-559

KAWAI, CH., KONISHI, T., MATSUYAMA, E., OKAZAKI, H. (1981)
Comparative effects of three calcium antagonists, diltiazem, verapamil and nifedipine, on the sinoatrial and atrioventricular nodes. Experimental and clinical studies.
Circulation 63, 1035-1042

KOHLHARDT, M., BAUER, R., KRAUSE, H., FLECKENSTEIN, A. (1972)
Differentiation of the transmembrane Na and Ca channels in mammalian cardiac fibres by the use of specific inhibitors.
Pflügers Arch. 335, 309-322

MANNHOLD, R., STEINER, R., HAAS, W., KAUFMANN, R. (1978)
Investigations on the structure-activity relationships of verapamil.
Naunyn Schmiedebergs Arch. Pharmacol. 302, 217-226

MANNHOLD, R., ZIERDEN, P., BAYER, R., RODENKIRCHEN, R., STEINER, R. (1981)
The influence of aromatic substitution on the negative inotropic action of verapamil in the isolated cat papillary muscle.
Arzneim. Forsch. 31, 773-780

McCANS, J.L., LINDENMAYER, G.E., MUNSON, R.G., EVANS, R.W., SCHWARTZ, A. (1974)
A dissociation of positive staircase (Bowditch) from ouabain-induced positive inotropism. Use of verapamil.
Circ. Res. 35, 439-447

NAWRATH, H., TEN EICK, R.E., McDONALD, T.F., TRAUTWEIN, W. (1977)
On the mechanism underlying the action of D-600 on slow inward current and tension in mammalian myocardium.
Circ. Res. 40, 408-414

NAWRATH, H. (1979)
Cardiac effects of Verapamil and D 600.
Prog. Pharmacol. 2, 55-68

REUTER, H. (1973)
Divalent cations as charge carriers in excitable membranes.
Progr. Biophys. molec. Biol. 26, 3-43

REUTER, H. (1979)
Properties of two inward membrane currents in the heart.
Ann. Rev. Physiol. 41, 413-424

RODENKIRCHEN, R. (1981)
unveröffentlichte Beobachtungen

ROSEN, M.R., WIT, A.L., HOFFMAN, B.F. (1975)
Appraisal and reappraisal of cardiac therapy.
Electrophysiology and pharmacology of cardiac arrhythmias.
VI. Cardiac effects of verapamil.
Am. Heart J. 89, 665-673

SEIPEL, L, BOTH, A., BLEICHMANN, U., LOOGEN, F. (1974)
Effects of antiarrhythmic drugs on sinus node and cardiac conduction in man.
World Congress of Cardiology, Buenos Aires; Abstracts No. 140

SIMURDA, J., SIMURDOVA, M., BRAVENY, P., SUMBERA, J. (1976)
Slow inward current and action potentials of papillary muscles under non-steady state conditions.
Pflügers Arch. 326, 209-218

SINGH, B.N., WILLIAMS, E.M.V. (1972)
A fourth class of anti-dysrhythmic action? Effect of verapamil on ouabain toxicity, on atrial and ventricular intracellular potentials, and on other features of cardiac function.
Cardiovasc. Res. 6, 109-119

SINGH, B.N., ELLRODT, G., PETER, C.T. (1978)
Verapamil: A review of its pharmacological properties and therapeutic use.
Drugs 15, 169-197

SURAWICZ, B. (1974)
Calcium responses ("Calcium spikes").

Am. J. Cardiol. 33, 689-690

THORENS, S., HAEUSLER, G. (1978)
Effects of some vasodilators on Ca-fluxes in vascular smooth muscle.
Experientia 34, 930

TRITTHART, H., KAUFMANN, R., VOLKMER, H.P., BAYER, R., KRAUSE, H. (1973)
Ca-movement controlling myocardial contractility I.
Voltage-, current- and time-dependence of mechanical activity under voltage clamp conditions.
Pflügers Arch. 338, 207-231

WIT, A.L., CRANEFIELD, P.F. (1974)
Effect of verapamil on the sinoatrial and atrioventricular nodes of the rabbit and the mechanism by which it arrests reentrant atrioventricular nodal tachycardia.
Circ. Res. 35, 413-425

LEBENSLAUF

Am 06.01.1952 wurde ich als drittes Kind der Eheleute Gerhard und Liselotte Epp, geborene Schnizler, in Reutlingen (Baden-Württemberg) geboren.

Daselbst besuchte ich nach vierjähriger Grundschulzeit das Friedrich-List-Gymnasium von 1963 bis zur Erlangung der Hochschulreife 1971.

Nach Ableistung des Wehrdienstes bei der deutschen Bundeswehr studierte ich drei Semester lang Wirtschaftswissenschaften und Betriebswirtschaftslehre an der Albert-Ludwig-Universität in Freiburg und an der Universität des Saarlandes.

Ab dem Sommersemester 1974 begann ich das Studium der Humanmedizin an der Universität Düsseldorf, an der ich im Mai 1981 das Staatsexamen ablegte.

Reutlingen, den 10.12.1981

Gerhard Epp
Charlottenstr. 66
7410 Reutlingen